

**Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Emérito Dr. Rodolfo R. Brenner**

# Análisis estructural y funcional de proteínas solubles que unen lípidos de intestino e hígado

*Structure-function analysis of soluble lipid binding proteins from intestine and liver*

*Análise estrutural e funcional de proteínas solúveis que ligam lipídeos de intestino e fígado*

- Lisandro Jorge Falomir-Lockhart<sup>1a,b</sup>, Betina Córscico<sup>2a</sup>, Gisela Raquel Franchini<sup>3a</sup>, Eduardo De Gerónimo<sup>4a</sup>, Luciana Rodriguez-Sawicki<sup>5a</sup>, Natalia Botasso<sup>6a</sup>

<sup>1</sup> Dr. De la Facultad de Ciencias Exactas area Cs. Biológicas, UNLP.

<sup>2</sup> Dr. en Bioquímica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

<sup>3</sup> Dr. en Ciencias Biológicas, Fac. de Cs. Biológicas, UNLP.

<sup>4</sup> Dr. de la Facultad de Ciencias Exactas, área Cs. Biológicas, UNLP.

<sup>5</sup> Lic. en Bioquímica, Fac. de Cs Exactas, UNLP

<sup>6</sup> Química, Fac. de Cs. Exactas, UNLP.

## Lugares de Trabajo

<sup>a</sup> Laboratorio de Biofísicoquímica de Proteínas que Unen Lípidos, INIBIOLP, Calle 60 y 120 s/n, Facultad de Cs. Médicas (CONICET-UNLP), (1900) La Plata, Argentina.

<sup>b</sup> Laboratory of Cellular Dynamics, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, (37077) Göttingen, Alemania

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

## Resumen

Luego de la ingesta, el epitelio del intestino delgado está encargado de asimilar grandes cantidades de nutrientes, como aminoácidos, glúcidos y ácidos grasos. Las proteínas solubles que unen lípidos cumplirían un rol determinante en este proceso, sobre todo protegiendo la integridad del tejido contra el efecto simil-detergente de los ácidos grasos provenientes de la dieta. En enterocitos se expresan dos proteínas que unen ácidos grasos de cadena larga, IFABP y LFABP, para las cuales no se conocen bien aún sus funciones específicas, o el porqué de la necesidad de dos proteínas aparentemente equivalentes. Este laboratorio se ha enfocado en el estudio comparativo de estas dos proteínas empleando distintas variantes estructurales y métodos bioquímicos, biofísicos, y de biología molecular y celular. Así, se han podido definir los determinantes moleculares de cada proteína responsables de la interacción con membranas, los mecanismos de transferencia de ligandos y los factores que modulan estas propiedades. Más recientemente, se han extendido estos ensayos a cultivos celulares donde se ha correlacionado la expresión de estas proteínas con la secreción de citoquinas, la proliferación y la diferenciación celular. El estudio de estas proteínas es de gran importancia por su potencial como blancos terapéuticos y su utilidad en el diagnóstico de injurias tisulares.

**Palabras clave:** proteínas solubles que unen lípidos \* metabolismo de ácidos grasos \* epitelio intestinal \* fluorescencia

## Summary

*After ingestion, the epithelium of the small intestine is responsible for assimilating large amounts of nutrients such as amino acids, sugars and fatty acids.*

*Soluble lipid binding proteins fulfill a determining role in this process, especially protecting the tissue integrity against the detergent-like effect of fatty acids from the diet. Two proteins that bind long-chain fatty acids are expressed in enterocytes, IFABP and LFABP, whose specific functions are still poorly understood, or the reason for the need of two apparently equivalent proteins. Our laboratory has focused on the comparative study of these two proteins using structural variants and biochemical, biophysical, and molecular and cellular biology approaches. Thus, the molecular determinants responsible for the interaction with membranes were defined for each protein, their ligand transfer mechanism and the factors that modulate these properties. More recently, these assays have been extended to cell culture studies which correlate the expression of these proteins with cytokine secretion, cell proliferation and differentiation. The study of these proteins is of great importance due to their potential as therapeutic targets and their usefulness in the diagnosis of tissue injury.*

**Key words:** *soluble lipid binding proteins \* fatty acid metabolism \* intestinal epithelium \* fluorescence*

## Resumo

*Após a ingestão, o epitélio do intestino delgado é responsável pela assimilação de uma grande quantidade de nutrientes, tais como aminoácidos, glicídios e ácidos graxos. As proteínas solúveis que ligam lipídeos desempenhariam um papel determinante neste processo, principalmente protegendo a integridade do tecido contra o efeito detergente dos ácidos graxos da dieta. Nos enterócitos se expressam duas proteínas que ligam ácidos graxos de cadeia longa, IFABP e LFABP; cujas funções específicas ainda não são muito conhecidas, ou não se conhece o motivo pelo qual são necessárias duas proteínas aparentemente equivalentes. Nosso laboratório tem se focado no estudo comparativo destas duas proteínas utilizando variantes estruturais e métodos bioquímicos, biofísicos, e de biologia molecular e celular. Assim, foi possível definir os determinantes moleculares de cada proteína responsáveis pela interação com membranas, os mecanismos da transferência de ligantes e os fatores que modulam essas propriedades. Mais recentemente, estendemos estes ensaios para culturas celulares, correlacionando a expressão destas proteínas com a secreção de citocinas, a proliferação e a diferenciação celular. O estudo destas proteínas é de grande importância por seu potencial como alvos terapêuticos e sua utilidade no diagnóstico de lesões teciduais.*

**Palavras-chave:** *proteínas solúveis que ligam lipídeos \* metabolismo de ácidos graxos \* epitélio intestinal \* fluorescência*

## Introducción

El transporte de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) a través del enterocito es un paso fundamental en la asimilación de los mismos. Estos sirven principalmente como fuente de energía metabólica y como sustrato para la biogénesis de membranas en todo el organismo. Además, los AGCL son importantes precursores de segundos mensajeros y pueden modular la expresión de genes específicos (1). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que los ácidos grasos dietarios son transportados desde la luz intestinal hacia el interior del enterocito y su tráfico dentro del mismo hasta su reesterificación en Triglicéridos (TAG) o Fosfolípidos (FL) no son aún completamente entendidos (2).

Los lípidos dietarios están principalmente formados por TAG, que son hidrolizados y liberan grandes cantidades de AGCL, los cuales llegan hasta la superficie celular en forma de micelas con ácidos biliares. La asimilación de los ácidos grasos es un proceso complejo, que involucra tanto la difusión pasiva como el transporte mediado por proteínas de membrana (3), y debe adaptarse a las grandes variaciones del contenido luminal. Una vez dentro de los enterocitos, los AGCL pue-

den ser unidos reversiblemente a FABP2 o IFABP (de sus siglas en inglés *Intestinal Fatty Acid Binding Protein*) y FABP1 o LFABP (*Liver Fatty Acid Binding Protein*), dos miembros de la familia de Proteínas Solubles que Unen Lípidos expresadas aproximadamente en concentraciones equivalentes en el epitelio intestinal (4-6). La acilación de los AGCL por las AcilCoASintasas (ACS) es el primer paso en el metabolismo celular de los mismos y, durante el período postprandial, estos son principalmente reesterificados a TAG y FL antes de su asociación con apolipoproteínas para ser secretados a la linfa como quilomicrones. Se ha hipotetizado que las FABPs intestinales participan en el transporte intracelular y el procesamiento de las grandes cantidades de AGCL absorbidos por el intestino. Trabajos recientes han comenzado a elucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales esto se llevaría a cabo (7-13).

Las FABPs son una familia de proteínas con al menos 10 miembros que, a pesar de compartir una identidad de secuencia tan baja como el 20%, comparten una estructura tridimensional prácticamente superponible. Originalmente se han nombrado a partir del tejido del cual se aislaron (AFABP de tejido adiposo, HFABP de corazón, TFABP de testículo, KFABP de que-

ratocitos, etc.), y durante mucho tiempo se creyó que sólo el intestino compartía dos miembros debido a sus necesidades de adaptación a las altas concentraciones de lípidos que debía asimilar de la dieta (14). Así, una de las funciones principales otorgadas a las FABPs fue la de proteger a las células contra el efecto tóxico de los ácidos grasos símil-detergentes. La mayoría de las FABPs puede unir sólo un AGCL; pero la LFABP puede unir dos, y además muestra afinidad por otros ligandos. Estas diferencias estructurales y la expresión específica en distintos tejidos llevó a pensar que las FABPs no sólo representaban un ejemplo de redundancia evolutiva (que de por sí resalta su importancia para la fisiología de cada tejido), sino que también sugiere que estas proteínas podrían estar cumpliendo además funciones específicas (14). Trabajos previos sugieren que las FABPs que son coexpresadas en un mismo tejido podrían estar direccionando el metabolismo de AGCL hacia distintos destinos (ver más adelante) (Fig. 1). Recientemente, las FABPs han cobrado gran interés por dos razones. Por un lado, se ha descrito su capacidad de participar

como reguladores, ya sea de vías metabólicas o de la expresión de genes, mediando también en el accionar de drogas empleadas para tratar la diabetes o la aterosclerosis. Esta función pareciera estar íntimamente relacionada a su capacidad de interaccionar con otras proteínas, principalmente enzimas (por ejemplo de la Lipasa Sensible a Hormonas, o HSL, con AFABP) y factores de transcripción (como el Receptor Activado de la Proliferación de Peroxisomas, o PPAR, con la LFABP) (15) (16). Por otro lado, distintos tipos de injuria tisular inducen irregularidades de la membrana plasmática de forma temporaria que permite la salida de proteínas y demás componentes citosólicos. Por su tamaño reducido ( $\approx 15$  kDa), las FABPs son de las primeras proteínas en escapar de los tejidos lesionados y pueden ser detectadas en suero (17), cobrando así gran importancia clínica para el diagnóstico de patologías como infarto de miocardio (HFABP), enfermedad celíaca (IFABP) o disfunciones crónicas renales (LFABP).

Desde hace 15 años en el INIBIOLP se han desarrollado proyectos orientados a dilucidar las funciones es-

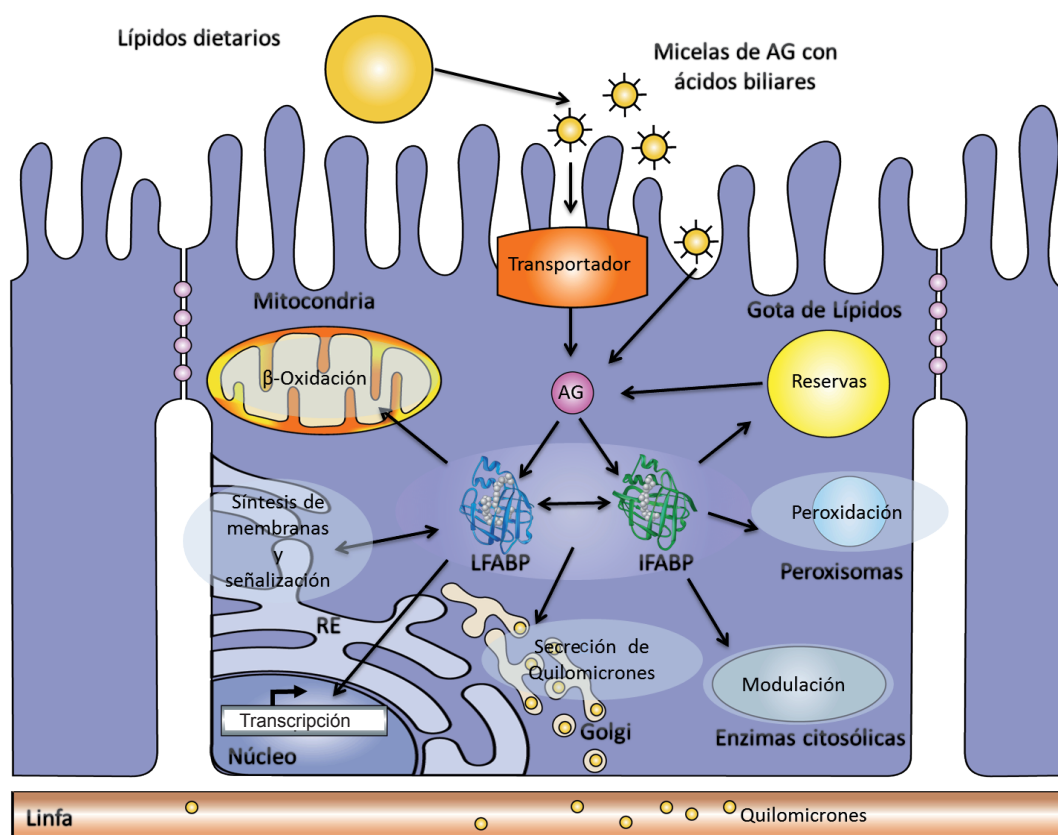


Figura 1. Participación de las FABPs intestinales en el direccionamiento del metabolismo de AGCL en el enterocito. Las FABPs captan los ácidos grasos (AG) luego de su asimilación desde la luz intestinal donde fueron inicialmente hidrolizados desde los TAG. Una vez unidos a IFABP y LFABP, la afinidad relativa de cada AG por ambas proteínas definiría su destino metabólico. Los AG podrían ser oxidados en mitocondrias o peroxisomas; ser activados como acil-CoAs y luego reestirificados en TAG y FL para la síntesis de quilomicrones y membranas en Retículo Endoplasmático (RE) y Golgi, o almacenados en gotas de lípidos; participar en la transducción de señales o bien en la regulación de la expresión génica.

pecíficas de esta familia de proteínas, y en particular de las isoformas coexpresadas en el intestino delgado: IFABP y LFABP. Para ello se han desarrollado y combinado una batería de técnicas basadas en fundamentos de bioquímica clásica, biología molecular, biofísica y biología celular. Para estos estudios se construyó una serie de mutantes puntuales de IFABP y LFABP, proteínas quiméricas entre ambas proteínas nativas y proteínas truncadas que han permitido establecer las bases moleculares de las funciones básicas que estas proteínas exhiben *in vitro*, la estequiometría y afinidad de unión de ligandos hidrofóbicos, la interacción con membranas fosfolipídicas modelo y los mecanismos de transferencia de ligandos hacia las mismas. En años recientes, los proyectos desarrollados extendieron estos estudios a condiciones más fisiológicas incorporando estudios en células en cultivo empleando la línea celular Caco-2, uno de los modelos más populares de epitelio intestinal. En las células en cultivo se han analizado el efecto de la expresión de estas proteínas sobre la captación y metabolismo de los AGCL, la secreción de citoquinas, el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular programada o apoptosis. Más recientemente, los proyectos se han diversificados para extender el análisis biofísico-químico y bioquímico a proteínas que unen lípidos de otras especies con intereses tanto biotecnológicos como relacionados a la salud pública y animal; como por ejemplo YLSCP-2 de *Yarrowia lipolytica* (levadura) (18) (19), EgFABP de *Echiniscoccus granulosus* (parásito) (20).

## Características estructurales de las FABPs y afinidad de ligandos

Las FABPs se caracterizan por adoptar una estructura tipo barril ligeramente elíptico, formado por 10 hojas- $\beta$ , y un motivo hélice-giro-hélice ubicado entre las hojas- $\beta$  A y B que funcionaría como tapa del barril (Fig. 2) (21) (22). Asimismo, el interior del barril define una cavidad donde se encuentra el sitio de unión de los ligandos hidrofóbicos y define la especificidad de ligandos de cada proteína. El uso de análogos fluorescentes de ácidos grasos ha permitido estudiar las propiedades de unión (estequiometría y afinidad) de las FABP intestinales expresadas en forma recombinante en *Escherichia coli*. Las FABPs se pueden diferenciar en al menos 4 subgrupos de acuerdo a su especificidad de ligando, al número de AGCL que pueden unir y a la posición que adoptan dichos ligandos en su sitio de unión (23). El primer grupo está formado por la LFABP, la LbFABP (esta última descrita sólo en reptiles y aves hasta el momento) y la I-BABP que presentan afinidad por una gran diversidad de ligandos y, en particular, la cavidad del barril puede ubicar hasta dos AGCL. Además, se ha observado la unión de lisofosfolípidos, monoacilglicerol, ácidos bi-

liares y grupos hemo. En el caso de AGCL, los dos sitios de unión muestran afinidades con un orden de magnitud de diferencia, uno de alta afinidad ( $K_D \approx 10\text{nM}$ ) y uno más superficial de menor afinidad ( $K_D \approx 200\text{nM}$ ) (9). Un segundo grupo está constituido sólo por la IFABP con un único sitio de unión para AGCL y la presencia característica de una arginina en posición 106 en el fondo del barril que forma un puente salino con el grupo carboxilato del ácido graso unido en forma extendida dentro del barril. El tercer grupo está formado por el resto de las FABPs (HFABP, AFABP, etc.) que también pueden ubicar un único AGCL, pero en este caso el ligando adopta una orientación tipo “U” al ser unido y no en forma extendida como en el caso anterior. El último grupo incluye a miembros de la familia de las FABPs que en realidad no unen AGCL sino retinoides, pero que por compartir la misma estructura tridimensional se asocian a la misma familia de proteínas.

Todos los mutantes puntuales analizados hasta el momento se pliegan normalmente y no presentan proble-

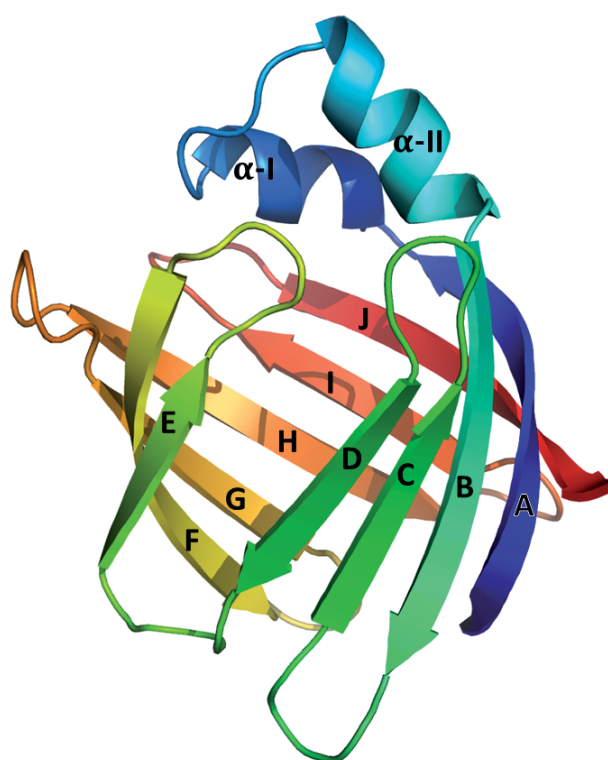


Figura 2. Estructura de las Proteínas Solubles que Unen Lípidos FABPs. Las proteínas miembro de la familia de las FABPs presentan una estructura tipo  $\beta$ -barril, ligeramente elíptico, y un motivo hélice-giro-hélice que funciona a modo de tapa del barril. El barril está formado por dos láminas, de 5 hojas- $\beta$  cada una, que definen el sitio de unión de ligandos. Las dos  $\alpha$ -hélices se ubican entre las hojas- $\beta$  A y B. Éstas últimas, junto con los giros- $\beta$  C-D y E-F, conforman el dominio portal, a través del cual los ácidos grasos pueden ingresar o salir del sitio de unión.



mas de estabilidad (11) (13). En el caso de las proteínas quimeras, estas se recuperan principalmente a partir de cuerpos de inclusión, por lo que deben ser desnaturadas y replegadas durante su purificación para su estudio; pero aún así adoptan una conformación similar a las proteínas nativas (9) (12). El plegamiento de estas proteínas está definido por un grupo de residuos hidrofóbicos que se localizan en la mitad inferior del barril- $\beta$  y los ligandos se unen principalmente en la cavidad de la mitad superior. Las variantes estructurales generadas en este laboratorio para IFABP y LFABP, al igual que por otros grupos en otros miembros de la familia de FABPs, indican que la afinidad de los ligandos está determinada mayormente por la región del barril- $\beta$ . Por tal razón, mutaciones de residuos cuyas cadenas laterales miran hacia el exterior del barril o de la región  $\alpha$ -helicoidal no alteran la afinidad de los ligandos. La construcción de quimeras que intercambian sólo la primera hoja- $\beta$  y la primera parte de la región  $\alpha$ -helicoidal tampoco parece afectar mayormente la estequiometría o la afinidad por los AGCL. Sin embargo, versiones abreviadas de IFABP con la remoción completa de la región  $\alpha$ -helicoidal sí muestran una disminución de la afinidad por AGCL, posiblemente debido a una menor estabilidad conformacional (24) (25). Por otro lado, la presencia de ligandos por lo general estabiliza la conformación de las FABPs impidiendo o enlenteciendo su degradación por proteasas *in vitro* (26).

Cabe destacar el desarrollo de una variante de IFABP conocida como ADIFAB, que está químicamente modificada con un grupo acrilodán en el interior del barril- $\beta$ , realizado por el grupo del Dr. Kleinfeld (27). Esta variante no solamente mantiene la capacidad de plegarse normalmente, sino que además posee la capacidad de sensar la presencia de ácidos grasos libres en solución. El grupo acrilodán es fluorescente y su espectro de emisión depende del entorno inmediato que lo rodea. De este modo, la unión de ligandos naturales desplazan moléculas de agua del sitio de unión y esto puede evidenciarse midiendo el espectro de fluorescencia y determinar la afinidad por ligandos naturales, directamente de la ADIFAB y por competencia también de las variantes estructurales de otras FABPs.

## Mecanismos de Transferencia de Ácidos Grasos e Interacción con Membranas

Las funciones clásicas asociadas a las FABPs son: 1) *buffer* citosólico contra las concentraciones tóxicas de AGCL provenientes de la dieta; y 2) transportadores citosólicos para que los AGCL puedan ser utilizados tanto en la biosíntesis de membranas (reesterificación como fosfolípidos) o lipoproteínas (como TAG) o bien

ser oxidados para la obtención de energía a nivel mitocondrial (14). En cualquiera de estos casos, los AGCL deben atravesar la membrana apical de los enterocitos gracias a las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs y FAT/CD36) y luego ser distribuidos a los distintos destinos metabólicos. Aquí es donde la co-expresión de más de una FABP podría estar modulando la distribución de AGCL preferencialmente a distintos destinos. Esta posibilidad se basa en el hecho de que tanto IFABP como LFABP muestran mecanismos de transferencia de AGCL muy distintos. Mientras IFABP pareciera transferir su carga mediante la interacción directa con membranas blanco, especialmente si tienen carácter aniónico, la LFABP sólo libera su carga al medio acuoso y es éste el que debe difundir hasta encontrar su blanco (28).

Empleando un análogo fluorescente antroiloxi-derivado de ácidos grasos (AOFAs, por sus siglas en inglés), se puede estudiar la transferencia de ligandos desde las FABPs hacia membranas modelo de vesículas unilamellares pequeñas (SUVs) monitoreando la fluorescencia del mismo en un módulo de cinéticas rápidas. El ensayo de transferencia de energía de resonancia (FRET) requiere también que las SUVs contengan un quencher o aceptor FRET (28). Los resultados obtenidos con distintas variantes estructurales de las FABPs han permitido determinar las bases moleculares responsables de las diferencias que se observan entre IFABP y LFABP en cuanto a la velocidad de transferencia de AOFAs hacia membranas y los factores que la afectan. Así, IFABP es sensible a las características de las vesículasceptoras (concentración, carga, composición de fosfolípidos) mediante un claro mecanismo colisional que libera al ligando en un proceso de pasos múltiples que involucra cambios conformacionales de la proteína luego de reconocer la membrana blanco (7) (9-11) (13) (28). Por otro lado, la LFABP sólo es sensible a factores que afectan la solubilidad del ligando en el medio dispersante (fuerza iónica y ligando específico), y no a las propiedades de la SUV aceptor, por lo que a este mecanismo de transferencia de ligandos se lo denominó "difusional" (9) (12) (28).

Los trabajos realizados empleando proteínas quimeras donde se intercambian las regiones  $\alpha$ -helicoidales de IFABP y LFABP han indicado que esta región es crítica para determinar su mecanismo característico de transporte de ácidos grasos y para la interacción física con membranas, vinculando la estructura de las mismas con su función (7) (9) (12). Más aún, se ha observado que existe una correlación entre el potencial electrostático superficial a través de la región  $\alpha$ -helicoidal de las FABPs y el mecanismo de transferencia *in vitro* (29). Por otra parte, se ha detectado que ambas proteínas son capaces de interaccionar físicamente con membranas, y que dicha interacción es modulada por la presencia del ligando y por las características de las membranas

(30). La modulación ejercida por estos factores influye de forma diferente sobre IFABP y LFABP. Asimismo, se ha determinado la influencia de los residuos hidrofóbicos y de residuos cargados del dominio  $\alpha$ -helicoidal en el mecanismo colisional de transferencia (10)(11). En conjunto estos resultados indican que los segmentos helicoidales son relevantes para la interacción de estas proteínas con membranas, y podrían también estar vinculados a la interacción con proteínas, contribuyendo de esta forma al transporte vectorial de sus ligandos. Por otra parte, estudios recientes empleando ligandos naturales han demostrado que LFABP es capaz de transferir ácidos grasos y acil-CoAs hacia membranas en forma diferencial (13).

Estos resultados permiten suponer que ambas proteínas estarían involucradas en el direccionamiento específico de ligandos desde y hacia diferentes membranas; IFABP cumpliría esta función a través del reconocimiento de membranas de composición específica; mientras que LFABP lo haría a través de su posibilidad de distinguir ligandos de diversa naturaleza. Aunque la idea de un mecanismo "difusional" coincide bien con la propuesta del *buffer* citosólico de AGCL, la relevancia biológica de este mecanismo de transferencia para las FABPs resulta al menos cuestionable, y uno debe entenderlo como una característica de su estudio *in vitro*. En entornos celulares otros factores entran en juego, y en particular la interacción con otras proteínas y la liberación de ligandos en forma específica, no a membranas, sino a enzimas del metabolismo de lípidos o factores de transcripción pueden ser tanto o más importantes que el observado *in vitro* desde IFABP hacia SUVs. Los mecanismos celulares subyacentes al posible rol de las FABPs en el tránsito intracelular de lípidos permanecen desconocidos y podrían involucrar interacciones proteína-membrana, ampliamente estudiadas *in vitro*, tanto como interacciones con otras proteínas del enterocito, que aún no han sido analizadas en profundidad.

## Asimilación de Ácidos Grasos y FABPs en Células Caco-2

A fin de dilucidar las funciones específicas de IFABP y LFABP en el enterocito se comenzó una serie de ensayos en células Caco-2 como modelo de epitelio intestinal. A fin de correlacionar la expresión de las FABPs con las funciones celulares se desarrolló un modelo en el que la expresión de LFABP está disminuida por la técnica de ARN de interferencia (o ARNi). Se aislaron dos clones y se analizaron sus propiedades de asimilación de ácidos grasos, crecimiento y diferenciación. Las células deficientes en LFABP mostraron una disminución en su capacidad de internalizar oleato desde la cara apical de una monocapa de células diferenciadas,

así como su metabolismo posterior tanto hacia FL como TAG. El exceso de oleato libre en análisis de composición de lípidos totales indica además la incapacidad de estas células de activar el oleato como oleil-CoA para su posterior metabolismo o degradación (manuscrito en preparación). Ya que las células Caco-2 no muestran niveles significativos de IFABP en condiciones normales de cultivo ni aún diferenciadas, y tampoco se observó una compensación luego del tratamiento por ARNi de LFABP, se planea repetir estos estudios en un modelo análogo en donde se sobre-exprese esta proteína tanto en células deficientes en LFABP como controles.

Por otro lado, recientemente se ha enfocado el estudio de la incidencia de ciertos componentes de la dieta en el condicionamiento de la respuesta inmune a nivel del epitelio intestinal, lo que tiene gran importancia en desórdenes alimentarios de carácter autoinmune, como la Enfermedad Celíaca. Para ello se han determinado los cambios en los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en células Caco-2 incubadas con distintas concentraciones de AGCL. De este modo, se ha demostrado que la exposición a oleato induce la expresión de IL-6 e IL-8 en sólo 3 h de iniciada la exposición. Se han puesto a punto las técnicas y el paso siguiente será repetir los ensayos en los modelos celulares antes mencionados.

## Conclusiones

El estudio de las proteínas solubles que unen lípidos ha crecido considerablemente en los últimos años, y sus funciones y participación en distintos procesos celulares son cada vez más diversas en la literatura. Publicaciones recientes reportan la participación de miembros de la familia de las FABPs en la regulación de vías de transducción de señales (31), la actividad de enzimas del metabolismo de lípidos (32), o el transporte de ligandos naturales o drogas al núcleo para descargarlas en los factores de transcripción, que son blancos de su acción terapéutica (16). Además, reportes recientes describen la secreción de lipoquinas (citoquinas de carácter lipídico, y no proteico) como el palmitoleico (16:1 n7) por el tejido adiposo, asociado a la expresión de la AFABP (33). El palmitoleico funcionaría como uno de los grandes reguladores del metabolismo lipídico a nivel sistémico, coordinando el metabolismo entre tejidos, y en particular con el hígado. Mecanismos similares podrían vincular el metabolismo lipídico con otros tejidos, y en particular con el sistema nervioso central, donde su señal podría integrarse con las de otras hormonas y citoquinas. El desarrollo de inhibidores cobraría entonces gran importancia para el tratamiento de desórdenes metabólicos (34). El desarrollo de inhibidores específicos para cada una de las FABPs es un campo de trabajo

actual y, por ejemplo, ya hay disponibles compuestos que bloquean la unión de ligandos a la AFABP testeados en células en cultivo y ratones (35). Las FABPs de intestino no deberían estar exentas de la posibilidad de ser moduladas por drogas, y en este caso sus aplicaciones podrían extenderse al tratamiento de desórdenes malabsortivos, diabetes, aterosclerosis o cáncer. Para ello es necesario comprender mejor las funciones de estas proteínas en la fisiopatología intestinal.

#### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha recibido el apoyo de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) de Argentina a través de los subsidios PICT-26218 y PICT-0506, y de la Wellcome Trust (Reino Unido) a través del subsidio 083625 otorgados a BC. LJFL agradece también el apoyo de la Fundación Alexander von Humboldt (Alemania). EDG, LRS son becarios CONICET; y NB recibe una beca de la CIC (Prov. de Buenos Aires).

#### CORRESPONDENCIA

DR. LISANDRO J FALOMIR LOCKHART  
INIBIOLP

Calle 60 y 120 s/n, Fac. de Cs. Médicas de La Plata (UNLP),  
1900 LA PLATA, Argentina  
E-mail: lfalomir@atlas.med.unlp.edu.ar

#### Referencias bibliográficas

1. Bu SY, Mashek MT, Mashek DG. Suppression of long chain acyl-coa synthetase 3 decreases hepatic de novo fatty acid synthesis through decreased transcriptional activity. *J Biol Chem* 2009; 284: 30474-83.
2. Niot I, Poirier H, Tran TTT, Besnard P. intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res* 2009; 48: 101-15.
3. Mansbach CM II, Gorelick F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *A. J Physiol-Gastroint Liver Physiol* 2007; 293: G645-G650.
4. Ockner RK, Manning JA. Fatty acid-binding protein in small-intestine - identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty-acid transport. *J Clin Invest* 1974; 54: 326-38.
5. Ockner RK, Ho WKL, Poppenha R, Manning JA. Binding protein for fatty-acids in cytosol of intestinal-mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* 1972; 177: 56-67.
6. Mishkin S, Turcotte R. Binding of long-chain fatty-acid coa to z - cytoplasmic protein present in liver and other tissues of rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 57: 918-26.
7. Córscico B, Cistola DP, Frieden C, Storch J. The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collis; 1998; 95: 12174-8.
8. Wu F, Córscico B, Flach CR, Cistola DP, Storch J, Mendelsohn R. Deletion of the helical motif in the intestinal fatty acid-binding protein reduces its interactions with membrane monolayers: brewster angle microscopy, IR reflection-absorption spectroscopy, and surface pressure studies. *Biochemistry*; 2001 40: 1976-83.
9. Córscico B, Liou HL, Storch J. The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochemistry* 2004; 43: 3600-7.
10. Córscico B, Franchini GR, Hsu KT, Storch J. Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions. *J Lipid Res* 2005; 46: 1765-72.
11. Falomir Lockhart LJ, Laborde L, Kahn PC, Storch J, Córscico B. Protein-membrane interaction and fatty acid transfer from intestinal fatty acid-binding protein to membranes - support for a multistep process. *J Biol Chem* 2006; 281: 13979-89.
12. Franchini GR, Storch J, Córscico B. The integrity of the alpha-helical domain of intestinal fatty acid binding protein is essential for the collision-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2008; 1781: 192-9.
13. De Geronimo E, Hagan RM, Wilton DC, Córscico B. Natural ligand binding and transfer from liver fatty acid binding protein (LFABP) to membranes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2010; 1801: 1082-9.
14. Storch J, Córscico B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 2008; 28: 73-95.
15. Smith AJ, Sanders MA, Thompson BR, Londos C, Kraemer FB, Bernlohr DA. Physical association between the adipocyte fatty acid-binding protein and hormone-sensitive lipase - a fluorescence resonance energy transfer analysis. *J Biol Chem* 2004; 279: 52399-405.
16. Hostetler HA, McIntosh AL, Atshaves BP, Storey SM, Payne HR, Kier AB, *et al.* L-FABP Directly interacts with ppar alpha in cultured primary hepatocytes. *J Lipid Res* 2009; 50: 1663-75.
17. Pelsers M, Hermens WT, Glatz JFC. fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* 2005; 352: 15-35.
18. Falomir Lockhart LJ, Burgardt NI, Ferreyra RG, Ceolin M, Ermacora MR, Córscico B. Fatty acid transfer from yarrowia lipolytica sterol carrier protein 2 to phospholipid membranes. *Biophys J* 2009; 97: 248-56.
19. Burgardt NI, Ferreyra RG, Falomir Lockhart LJ, Córscico B, Ermacora MR, Ceolin M. Biophysical characterisation and urea-induced unfolding of recombinant yarrowia lipolytica sterol carrier protein-2. *Biochim Biophys Acta - Prot Proteom* 2009; 1794: 1115-22.
20. Porfido JL, Alvite G, Silva V, Kennedy MW, Esteves A, Córscico B. Direct interaction between egfabp1, a fatty acid binding protein from echinococcus granulosus, and phospholipid membranes. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1893.

21. Thompson J, Winter N, Terwey D, Bratt J, Banaszak L. The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein - a complex with two bound oleates. *J Biol Chem* 1997; 272: 7140-50.
22. Muga A, Cistola DP, Mantsch HH. A comparative-study of the conformational properties of escherichia-coli-derived rat intestinal and liver fatty-acid binding-proteins. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1162: 291-6.
23. Haunerland NH, Spener F. Fatty acid-binding proteins - insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res* 2004 43: 328-49.
24. Franchini GR, Curto LM, Caramelo JJ, Delfino JM. Dissection of a beta-barrel motif leads to a functional dimer: the case of the intestinal fatty acid binding protein. *Protein Sci* 2009; 18: 2592-602.
25. Curto LM, Caramelo JJ, Franchini GR, Delfino JM. Delta 98 Delta, a minimalist model of antiparallel beta-sheet proteins based on intestinal fatty acid binding protein. *Protein Sci* 2009; 18: 735-46.
26. Curto LM, Caramelo JJ, Delfino JM. Delta 98 Delta, a functional all-beta-sheet abridged form of intestinal fatty acid binding protein. *Biochemistry* 2005; 44: 13847-457.
27. Richieri GV, Kleinfeld AM. Unbound free fatty-acid levels in human serum. *J Lipid Res* 1995; 36: 229-40.
28. Hsu KT, Storch J. Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J Biol Chem* 1996; 271: 13317-23.
29. Di Pietro SM, Córscico B, Perduca M, Monaco HL, Santome JA. Structural and biochemical characterization of toad liver fatty acid-binding protein. *Biochemistry* 2003; 42: 8192-203.
30. Falomir Lockhart LJ, Franchini GR, Guerbi MX, Storch J, Córscico B. Interaction of enterocyte fabps with phospholipid membranes: clues for specific physiological roles. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2011; 1811: 452-9.
31. Thompson BR, Mazurkiewicz-Munoz AM, Suttles J, Carter-Su C, Bernlohr DA. Interaction of adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP) and Jak2 AFABP/AP2 as a regulator of Jak2 signaling. *J Biol Chem* 2009; 284: 13473-80.
32. Smith AJ, Thompson BR, Sanders MA, Bernlohr DA. Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase - Regulation by fatty acids and phosphorylation. *J Biol Chem* 2007; 282: 32424-32.
33. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*; 2008; 134: 933-44.
34. Córscico B, Falomir-Lockhart LJ. Signals from the adipose tissue alter systemic metabolism. *Clin Lipidol* 2009; 4: 13-16.
35. Hertz AV, Hellberg K, Reynolds JM, Kruse AC, Juhlmann BE, Smith AJ, *et al.* Identification and characterization of a small molecule inhibitor of fatty acid binding proteins. *J Med Chem* 2009; 52: 6024-31.

**Aceptado para su publicación el 28 de diciembre de 2012**